



Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Sirih Hitam (*Piper Betle L. Var Nigra*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Enterococcus faecalis*

Satya Meilisa Raudhanti

Universitas Mulawarman

Masyhudi

Universitas Mulawarman

Yadi

Universitas Mulawarman

Alamat: Kampus Gunung Kelua, Jalan Kuaro, Samarinda, Kode Pos 75123

Korespondensi penulis: satyameilisa@gmail.com

Abstract. *Enterococcus faecalis* is a pathogenic bacterium that plays a significant role in persistent endodontic infections and is frequently associated with root canal treatment failure due to its ability to survive under nutrient-limited conditions. The exploration of natural products as alternative antibacterial agents has gained considerable attention, including the use of black betel leaf (*Piper betle L. var. nigra*) essential oil, which contains various bioactive compounds with antimicrobial properties. This study aimed to evaluate the antibacterial activity of black betel leaf essential oil against the growth of *Enterococcus faecalis*. A true experimental study with a post-test only control group design was conducted. The antibacterial activity was assessed using twelve concentrations of essential oil (4%, 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.062%, 0.031%, 0.015%, 0.007%, 0.003%, and 0.001%), with eugenol as the positive control and 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) as the negative control. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the microdilution method, followed by the streak plate technique on Nutrient Agar to determine the minimum bactericidal concentration (MBC). The results demonstrated that black betel leaf essential oil exhibited antibacterial activity against *E. faecalis*, as indicated by the presence of clear wells at several tested concentrations and the absence of bacterial colony growth on culture media following treatment. These findings suggest that black betel leaf essential oil has the potential to inhibit the growth of *Enterococcus faecalis* and may serve as a promising natural antibacterial agent for dental applications, particularly as a potential intracanal medicament in endodontic therapy.

Keywords: antibacterial activity, black betel leaf essential oil, *Enterococcus faecalis*, minimum bactericidal concentration, minimum inhibitory concentration, *Piper betle L. var. nigra*.

Abstrak. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri patogen yang berperan penting dalam infeksi endodontik persisten dan sering dikaitkan dengan kegagalan perawatan saluran akar karena memiliki kemampuan bertahan pada lingkungan dengan nutrisi terbatas. Pemanfaatan bahan alam sebagai agen antibakteri alternatif menjadi salah satu upaya untuk mengatasi permasalahan tersebut, salah satunya melalui minyak atsiri daun sirih hitam (*Piper betle* L. var. *nigra*) yang diketahui mengandung senyawa bioaktif dengan aktivitas antimikroba. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas antibakteri minyak atsiri daun sirih hitam terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Penelitian menggunakan rancangan true experimental dengan desain post-test only control group. Pengujian dilakukan terhadap 12 variasi konsentrasi minyak atsiri (4%; 2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,062%; 0,031%; 0,015%; 0,007%; 0,003%; dan 0,001%), disertai kontrol positif berupa eugenol dan kontrol negatif berupa DMSO 10%. Aktivitas antibakteri dievaluasi menggunakan metode mikrodilusi untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), kemudian dilanjutkan dengan metode streak plate pada media Nutrient Agar untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam memiliki aktivitas antibakteri terhadap *E. faecalis*, yang ditandai dengan adanya sumuran tetap jernih pada beberapa konsentrasi pengujian serta tidak ditemukannya pertumbuhan koloni bakteri pada media kultur setelah perlakuan. Temuan ini menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam berpotensi menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis* sehingga berpotensi dikembangkan sebagai bahan antibakteri alami dalam bidang kedokteran gigi, khususnya sebagai kandidat medikamen saluran akar.

Kata kunci: antibakteri, *Enterococcus faecalis*, kadar hambat minimum, kadar bunuh minimum, minyak atsiri, *Piper betle* L. var. *nigra*.

LATAR BELAKANG

Infeksi endodontik masih menjadi salah satu tantangan utama dalam praktik kedokteran gigi konservasi karena berkontribusi terhadap tingginya angka kegagalan perawatan saluran akar di berbagai negara. Meskipun perkembangan teknologi instrumentasi, sistem irigasi, dan medikamen intrakanal telah meningkatkan keberhasilan terapi endodontik, eliminasi mikroorganisme patogen dari sistem saluran akar yang kompleks masih belum dapat dicapai secara sempurna. Kompleksitas anatomi saluran akar, keberadaan tubulus dentin, serta kemampuan mikroorganisme membentuk biofilm menyebabkan bakteri mampu bertahan setelah prosedur cleaning and shaping, sehingga memicu infeksi persisten maupun reinfeksi. Kondisi ini menjadikan pencarian agen antimikroba baru yang lebih efektif, aman, dan berasal dari bahan alam sebagai salah satu fokus utama penelitian endodontik modern.

Di antara berbagai mikroorganisme penyebab infeksi endodontik, *Enterococcus faecalis* merupakan spesies yang paling sering diisolasi pada kasus infeksi saluran akar sekunder maupun persisten setelah perawatan endodontik. Bakteri Gram positif fakultatif anaerob ini memiliki kemampuan beradaptasi pada lingkungan dengan nutrisi terbatas, kadar oksigen rendah, dan kondisi pH basa sehingga tetap mampu bertahan meskipun telah dilakukan preparasi mekanis maupun aplikasi medikamen intrakanal. Selain itu, *E. faecalis* mampu membentuk biofilm yang berfungsi sebagai mekanisme pertahanan terhadap respons imun inang dan berbagai agen antimikroba. Biofilm tersebut menyebabkan penetrasi antibakteri menjadi lebih sulit sehingga meningkatkan resistensi bakteri terhadap terapi konvensional. Berbagai kajian terbaru bahkan menempatkan *E. faecalis* sebagai indikator biologis utama kegagalan perawatan saluran akar karena tingginya kemampuan kolonisasi dan persistensinya pada jaringan dentin.

Permasalahan tersebut semakin diperberat oleh meningkatnya perhatian dunia terhadap resistensi antimikroba (*antimicrobial resistance*). Penggunaan antibiotik maupun bahan kimia sintetis secara terus-menerus berpotensi mendorong munculnya strain bakteri yang lebih toleran terhadap terapi. Walaupun medikamen seperti kalsium hidroksida, klorheksidin, maupun natrium hipoklorit masih menjadi standar dalam terapi endodontik, beberapa penelitian menunjukkan bahwa efektivitasnya terhadap biofilm *E. faecalis* belum sepenuhnya optimal. Oleh karena itu, berbagai penelitian dalam lima tahun terakhir mulai mengembangkan pendekatan berbasis senyawa alami yang memiliki aktivitas multitarget terhadap membran sel, metabolisme, serta pembentukan biofilm bakteri sehingga diharapkan mampu mengurangi risiko resistensi sekaligus meningkatkan keamanan biologis.

Perkembangan penelitian fitofarmaka menunjukkan bahwa minyak atsiri merupakan salah satu kelompok metabolit sekunder tumbuhan yang memiliki aktivitas antibakteri cukup luas. Minyak atsiri mengandung berbagai senyawa bioaktif seperti fenol, monoterpen, seskuiterpen, dan turunannya yang bekerja melalui mekanisme kerusakan membran sitoplasma, peningkatan permeabilitas sel, gangguan sintesis ATP, hingga inhibisi pembentukan biofilm. Berbeda dengan antibiotik sintetis yang umumnya memiliki target spesifik, minyak atsiri bekerja melalui berbagai jalur biologis secara simultan sehingga lebih sulit diatasi oleh mekanisme resistensi bakteri. Kajian terbaru mengenai strategi pengendalian biofilm *E. faecalis* bahkan menempatkan berbagai

minyak atsiri sebagai kandidat potensial medikamen endodontik karena menunjukkan aktivitas antibakteri dan antibiofilm yang menjanjikan dalam berbagai penelitian *in vitro*.

Salah satu tanaman Indonesia yang berpotensi dikembangkan sebagai sumber minyak atsiri adalah sirih hitam (*Piper betle* L. var. *nigra*). Tanaman ini termasuk famili Piperaceae yang diketahui mengandung metabolit sekunder berupa flavonoid, alkaloid, tanin, saponin, steroid, serta minyak atsiri dengan kandungan senyawa fenolik yang berperan sebagai antibakteri dan antioksidan. Berdasarkan teori fitokimia, senyawa fenolik mampu menyebabkan denaturasi protein membran, meningkatkan permeabilitas dinding sel, serta menghambat aktivitas enzim esensial bakteri sehingga mengganggu proses metabolisme hingga menyebabkan kematian sel. Selain itu, flavonoid dan tanin juga diketahui mampu menghambat adhesi bakteri pada permukaan jaringan sehingga berpotensi mengurangi pembentukan biofilm. Karakteristik tersebut menjadikan minyak atsiri daun sirih hitam sebagai kandidat alami yang menjanjikan untuk dikembangkan dalam bidang endodontik. Informasi mengenai kandungan metabolit sekunder dan pemanfaatan minyak atsiri daun sirih hitam juga sejalan dengan uraian pada penelitian dasar yang menjadi landasan penelitian ini.

Berbagai penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa tanaman dari genus *Piper* memiliki aktivitas antibakteri terhadap berbagai bakteri patogen. Penelitian mengenai minyak atsiri *Piper betle* menunjukkan adanya kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif maupun Gram negatif melalui mekanisme kerusakan membran sel. Penelitian lain mengenai ekstrak sirih merah (*Piper crocatum*) juga melaporkan efektivitas terhadap *E. faecalis* sehingga membuka peluang pemanfaatan tanaman famili Piperaceae sebagai alternatif medikamen saluran akar. Selain itu, penelitian terbaru mengenai minyak atsiri sirih hijau menunjukkan bahwa senyawa utama seperti kavikol dan eugenol memberikan kontribusi penting terhadap aktivitas antibakteri.

Meskipun demikian, hasil-hasil penelitian tersebut juga memperlihatkan adanya variasi efektivitas yang dipengaruhi oleh spesies tanaman, metode ekstraksi, jenis pelarut, kandungan fitokimia, serta metode pengujian antibakteri yang digunakan. Sebagian besar penelitian terdahulu menggunakan metode difusi cakram atau difusi sumuran sehingga hanya menghasilkan ukuran zona hambat tanpa mampu menentukan konsentrasi hambat minimum (*minimum inhibitory concentration/MIC*) maupun konsentrasi bunuh minimum (*minimum bactericidal concentration/MBC*). Sebaliknya, penelitian-penelitian terkini

lebih banyak merekomendasikan penggunaan metode mikrodilusi karena memberikan hasil yang lebih akurat dan kuantitatif dalam menentukan efektivitas antibakteri suatu bahan uji. Perbedaan metodologi tersebut menyebabkan hasil antarpelitian sulit dibandingkan secara langsung sehingga diperlukan penelitian menggunakan metode mikrodilusi sebagai pendekatan yang lebih representatif dalam mengevaluasi aktivitas antibakteri minyak atsiri terhadap *E. faecalis*.

Penelitian mengenai pemanfaatan tanaman obat sebagai agen antibakteri endodontik menunjukkan perkembangan yang sangat pesat dalam beberapa tahun terakhir. Hasil sintesis berbagai penelitian mengindikasikan bahwa ekstrak tumbuhan maupun minyak atsiri memiliki aktivitas yang menjanjikan terhadap *Enterococcus faecalis*. Namun demikian, masih terdapat perbedaan hasil antarpelitian yang dipengaruhi oleh jenis tanaman, bagian tanaman yang digunakan, metode ekstraksi, komposisi fitokimia, konsentrasi bahan uji, serta metode pengujian aktivitas antibakteri. Sebagian penelitian melaporkan aktivitas antibakteri yang tinggi melalui metode difusi agar, sedangkan penelitian lain menunjukkan bahwa metode tersebut kurang mampu menggambarkan efektivitas sebenarnya karena hanya mengukur diameter zona hambat tanpa menentukan konsentrasi hambat minimum (*Minimum Inhibitory Concentration*; MIC) maupun konsentrasi bunuh minimum (*Minimum Bactericidal Concentration*; MBC). Oleh karena itu, berbagai tinjauan sistematis terbaru merekomendasikan penggunaan metode mikrodilusi sebagai pendekatan yang lebih sensitif, kuantitatif, dan dapat direproduksi dalam mengevaluasi efektivitas bahan antibakteri terhadap bakteri endodontik. Selain itu, evaluasi aktivitas antibiofilm juga mulai dipandang penting mengingat sebagian besar infeksi persisten disebabkan oleh komunitas biofilm, bukan bakteri planktonik semata.

Perbedaan metodologi tersebut mencerminkan adanya perdebatan ilmiah mengenai pendekatan terbaik dalam mengevaluasi aktivitas antibakteri bahan alam. Penelitian berbasis metode difusi relatif sederhana dan ekonomis, tetapi dipengaruhi oleh kemampuan difusi senyawa aktif pada media agar sehingga kurang sesuai untuk senyawa hidrofobik seperti minyak atsiri. Sebaliknya, metode mikrodilusi memungkinkan penentuan MIC dan MBC secara lebih objektif serta menjadi prosedur yang banyak direkomendasikan dalam penelitian antimikroba modern. Dengan demikian, kecenderungan metodologi dalam penelitian terkini mengarah pada penggunaan metode

mikrodilusi yang kemudian dikombinasikan dengan pengamatan pertumbuhan koloni menggunakan media kultur untuk memperoleh gambaran aktivitas bakteriostatik maupun bakterisidal secara lebih komprehensif. Pendekatan metodologis tersebut juga sejalan dengan rancangan penelitian ini yang menggunakan uji mikrodilusi untuk menentukan KHM dan metode streak plate pada media Nutrient Agar untuk menentukan KBM.

Meskipun tanaman dari genus *Piper* telah banyak diteliti sebagai sumber senyawa antimikroba, penelitian mengenai minyak atsiri daun sirih hitam (*Piper betle* L. var. *nigra*) terhadap *Enterococcus faecalis* masih sangat terbatas. Sebagian besar penelitian terdahulu lebih berfokus pada sirih hijau (*Piper betle* L.) atau sirih merah (*Piper crocatum*), sedangkan bukti ilmiah mengenai varietas sirih hitam masih didominasi oleh penelitian terhadap bakteri penyebab infeksi kulit atau bakteri pangan. Di sisi lain, penelitian dasar yang menjadi landasan studi ini menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Propionibacterium acnes*, tetapi belum tersedia bukti eksperimental yang secara khusus mengevaluasi aktivitasnya terhadap *Enterococcus faecalis* sebagai bakteri utama penyebab infeksi endodontik persisten. Kondisi tersebut menunjukkan adanya kesenjangan pengetahuan (research gap) yang masih perlu dijawab melalui penelitian eksperimental yang menggunakan metode pengujian yang lebih representatif.

Selain kesenjangan pada objek penelitian, terdapat pula kesenjangan pada aspek mekanisme pengujian. Kajian komprehensif terbaru menegaskan bahwa penelitian mengenai minyak atsiri terhadap *Enterococcus faecalis* masih didominasi oleh pengujian terhadap bentuk planktonik, sedangkan informasi mengenai efektivitas terhadap biofilm maupun hubungan antara aktivitas bakteriostatik dan bakterisidal masih relatif terbatas. Padahal, dalam praktik klinis endodontik, bakteri lebih sering ditemukan dalam bentuk biofilm yang memiliki tingkat toleransi lebih tinggi terhadap agen antimikroba. Oleh karena itu, penelitian yang mampu menghasilkan data mengenai MIC dan MBC merupakan langkah awal yang penting sebelum dilakukan pengembangan lebih lanjut menuju pengujian antibiofilm maupun aplikasi praklinis.

Berdasarkan sintesis literatur tersebut, kebaruan (*novelty*) penelitian ini terletak pada evaluasi aktivitas antibakteri minyak atsiri daun sirih hitam (*Piper betle* L. var. *nigra*) terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* menggunakan pendekatan mikrodilusi untuk menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) serta metode

streak plate untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Pendekatan ini diharapkan mampu memberikan informasi kuantitatif mengenai efektivitas minyak atsiri sebagai kandidat antibakteri alami yang lebih akurat dibandingkan penelitian sebelumnya yang umumnya hanya menggunakan metode difusi. Selain itu, penelitian ini juga memperluas bukti ilmiah mengenai potensi varietas sirih hitam yang hingga saat ini masih relatif jarang dieksplorasi dibandingkan spesies *Piper* lainnya. Informasi tersebut diharapkan dapat memperkaya pengembangan fitofarmaka di bidang kedokteran gigi, khususnya sebagai alternatif medikamen intrakanal yang lebih aman dan berkelanjutan.

Secara praktis, penelitian ini memiliki relevansi yang tinggi bagi pengembangan terapi endodontik berbasis bahan alam di Indonesia. Indonesia merupakan salah satu negara dengan keanekaragaman hayati terbesar di dunia dan memiliki berbagai spesies tanaman obat yang belum dimanfaatkan secara optimal dalam bidang kedokteran gigi. Pemanfaatan tanaman lokal sebagai sumber bahan aktif tidak hanya mendukung pengembangan obat berbasis sumber daya alam, tetapi juga sejalan dengan upaya mengurangi ketergantungan terhadap bahan kimia sintetis serta mendukung inovasi produk kesehatan nasional. Oleh karena itu, eksplorasi minyak atsiri daun sirih hitam tidak hanya memiliki nilai ilmiah, tetapi juga nilai strategis dalam pengembangan bahan antibakteri alami yang berpotensi diaplikasikan pada terapi infeksi saluran akar di masa mendatang.

Berdasarkan uraian tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas antibakteri minyak atsiri daun sirih hitam (*Piper betle L. var. nigra*) terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* melalui penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan bukti ilmiah mengenai potensi minyak atsiri daun sirih hitam sebagai kandidat agen antibakteri alami dalam bidang endodontik sekaligus menjadi dasar bagi penelitian lanjutan mengenai aktivitas antibiofilm, uji toksisitas, dan pengembangan formulasi medikamen intrakanal berbasis bahan alam.

METODE PENELITIAN

Metodologi penelitian ini disusun menggunakan pendekatan eksperimental laboratorik (*true experimental*) dengan rancangan *post-test only control group design* untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri minyak atsiri daun sirih hitam (*Piper betle L. var. nigra*) terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Desain ini dipilih karena mampu

mengendalikan pengaruh variabel luar serta memberikan validitas internal yang tinggi dalam pengujian efektivitas suatu agen antibakteri melalui perbandingan langsung antara kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Pendekatan eksperimental *in vitro* juga merupakan metode yang paling banyak digunakan dalam penelitian antibakteri endodontik karena memungkinkan evaluasi aktivitas bakteristatik dan bakterisidal secara terukur melalui penentuan Minimum Inhibitory Concentration (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) (Yang et al., 2024; Diouchi et al., 2024).

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari 2023 di Laboratorium Farmakologi dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Mulawarman. Subjek penelitian berupa isolat bakteri standar *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 yang diperoleh dari Laboratorium Indilab Loa Janan, Samarinda, sedangkan bahan uji berupa daun sirih hitam (*Piper betle* L. var. *nigra*) berasal dari wilayah Mugirejo, Kota Samarinda, Kalimantan Timur, dan telah dilakukan identifikasi botani oleh Fakultas Kehutanan Universitas Mulawarman. Penggunaan strain bakteri standar ATCC bertujuan untuk menjamin reproduktibilitas hasil penelitian dan meminimalkan variasi biologis antarisolat, sebagaimana direkomendasikan dalam penelitian mikrobiologi endodontik terkini (Oncu et al., 2024; Yang et al., 2024).

Minyak atsiri diperoleh melalui proses destilasi uap (*steam distillation*) terhadap daun sirih hitam yang telah dicuci, dirajang, kemudian disuling selama kurang lebih lima jam hingga dihasilkan distilat berupa campuran minyak atsiri dan air. Minyak atsiri selanjutnya dipisahkan menggunakan corong pisah, dikeringkan menggunakan asam sulfat (H_2SO_4), kemudian disimpan dalam vial steril sebelum digunakan pada pengujian antibakteri. Teknik destilasi uap dipilih karena merupakan metode yang mampu mempertahankan stabilitas senyawa volatil penyusun minyak atsiri sehingga banyak direkomendasikan dalam penelitian fitokimia maupun pengujian aktivitas biologis minyak atsiri (Diouchi et al., 2024).

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan menggunakan metode mikrodilusi (*broth microdilution*) pada mikroplate 96 sumur yang saat ini merupakan metode baku dalam penentuan MIC berbagai agen antimikroba. Penelitian menggunakan dua kelompok utama, yaitu kelompok perlakuan dan kelompok kontrol. Kelompok perlakuan terdiri atas dua belas konsentrasi minyak atsiri daun sirih hitam, yaitu 4%; 2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,062%; 0,031%; 0,015%; 0,007%; 0,003%; dan 0,001%. Kelompok kontrol

terdiri atas kontrol positif berupa eugenol dan kontrol negatif berupa dimetil sulfoksida (DMSO) 10%. Seluruh perlakuan dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan (triplicate) untuk meningkatkan reliabilitas hasil pengamatan. Suspensi bakteri disiapkan menggunakan media *Mueller Hinton Broth* (MHB) dan distandarisasi hingga mencapai kekeruhan setara 0,5–1 McFarland menggunakan spektrofotometer sebelum diinokulasikan ke dalam mikroplate. Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C, setiap sumur ditambahkan reagen Microtetrazolium (MTT). Sumur yang tetap berwarna jernih menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri dan ditetapkan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM/MIC), sesuai dengan prosedur yang umum digunakan dalam penelitian antibakteri minyak atsiri terhadap patogen endodontik (Makade et al., 2024; Diouchi et al., 2024).

Penentuan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM/MBC) dilakukan menggunakan metode streak plate. Sampel dari sumur mikroplate yang tidak menunjukkan perubahan warna dipindahkan sebanyak 5 µL ke media *Nutrient Agar* (NA), kemudian digores menggunakan kapas steril dan diinkubasi selama 18–24 jam pada suhu 37°C. Konsentrasi terendah yang tidak menunjukkan pertumbuhan koloni bakteri ditetapkan sebagai nilai KBM. Kombinasi metode mikrodilusi dan streak plate banyak direkomendasikan dalam penelitian antibakteri modern karena mampu membedakan efek bakteristatik dan bakterisidal suatu bahan uji secara lebih komprehensif dibandingkan metode difusi agar (Makade et al., 2024; Diouchi et al., 2024).

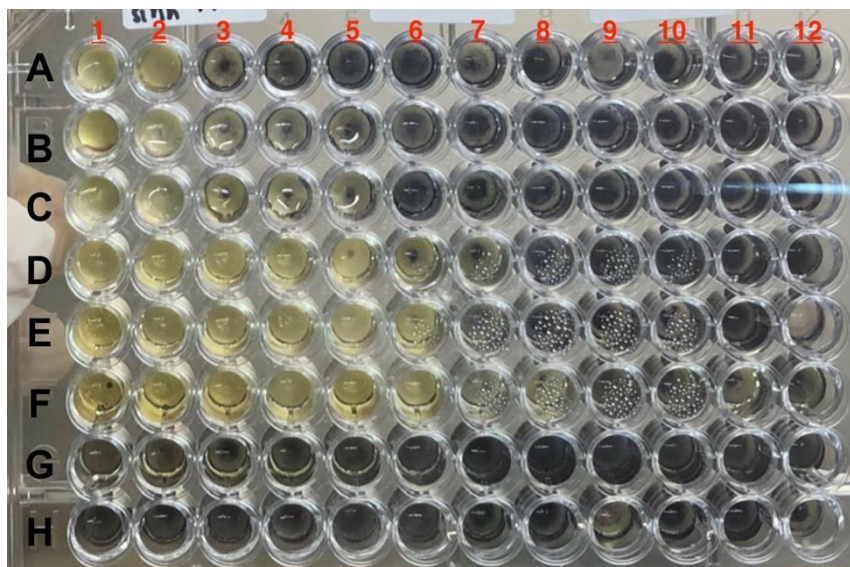
Instrumen penelitian meliputi alat destilasi uap minyak atsiri, autoklaf, inkubator, biosafety cabinet, mikroplate 96 sumur, mikropipet, spektrofotometer, timbangan analitik, cawan petri, tabung reaksi, dan peralatan mikrobiologi standar lainnya. Bahan penelitian terdiri atas minyak atsiri daun sirih hitam, kultur *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Mueller Hinton Broth* (MHB), *Nutrient Agar* (NA), eugenol sebagai kontrol positif, DMSO 10% sebagai kontrol negatif, aquadest steril, serta reagen MTT sebagai indikator viabilitas bakteri. Penggunaan eugenol sebagai kontrol positif didasarkan pada aktivitas antimikrobanya yang telah banyak dibuktikan terhadap bakteri endodontik sehingga dapat digunakan sebagai pembanding efektivitas minyak atsiri yang diuji.

Sumber data penelitian merupakan data primer yang diperoleh secara langsung melalui hasil pengamatan laboratorium terhadap perubahan warna media mikrodilusi untuk penentuan KHM serta pertumbuhan koloni bakteri pada media *Nutrient Agar* untuk

penentuan KBM. Data yang diperoleh bersifat kualitatif-deskriptif, yaitu berdasarkan ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri pada setiap konsentrasi perlakuan. Interpretasi hasil dilakukan dengan membandingkan aktivitas antibakteri minyak atsiri terhadap kontrol positif dan kontrol negatif sehingga dapat ditentukan konsentrasi efektif dalam menghambat maupun membunuh *Enterococcus faecalis*. Pendekatan ini sejalan dengan pedoman penelitian in vitro antibakteri yang menekankan pentingnya penentuan MIC dan MBC sebagai parameter utama efektivitas agen antimikroba terhadap patogen endodontik.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri minyak atsiri daun sirih hitam (*Piper betle* L. var. *nigra*) terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* melalui penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM). Pengujian dilakukan menggunakan metode mikrodilusi (*broth microdilution*) terhadap dua belas variasi konsentrasi minyak atsiri, yaitu 4%; 2%; 1%; 0,5%; 0,25%; 0,125%; 0,0625%; 0,031%; 0,015%; 0,0078%; 0,0039%; dan 0,0019%. Sebagai pembanding digunakan eugenol sebagai kontrol positif dan DMSO 10% sebagai kontrol negatif. Seluruh perlakuan dilakukan dalam tiga kali pengulangan untuk meningkatkan reliabilitas hasil pengujian.



Gambar 1. Hasil Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Minyak Atsiri Daun Sirih Hitam terhadap *Enterococcus faecalis*

Hasil pengamatan setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan adanya perubahan karakteristik warna pada sumuran mikroplate setelah penambahan reagen MTT. Sumuran yang tetap berwarna jernih diinterpretasikan sebagai tidak adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan perubahan warna menjadi ungu menunjukkan aktivitas metabolik bakteri masih berlangsung sehingga bakteri tetap hidup. Berdasarkan hasil pengamatan visual, sumuran dengan konsentrasi minyak atsiri 4% dan 2% tetap mempertahankan warna jernih pada seluruh pengulangan, sedangkan seluruh konsentrasi di bawah 2% mengalami perubahan warna menjadi ungu yang mengindikasikan adanya pertumbuhan *Enterococcus faecalis*.

Temuan tersebut menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri minyak atsiri daun sirih hitam mulai efektif menghambat pertumbuhan bakteri pada konsentrasi 2%. Dengan demikian, konsentrasi tersebut ditetapkan sebagai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) karena merupakan konsentrasi terendah yang masih mampu menghambat pertumbuhan *E. faecalis*. Sebaliknya, konsentrasi yang lebih rendah belum mampu memberikan efek penghambatan sehingga masih memperlihatkan aktivitas metabolisme bakteri yang ditandai dengan perubahan warna media.

Tabel 1. Penetapan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Minyak Atsiri Daun Sirih Hitam terhadap *Enterococcus faecalis*

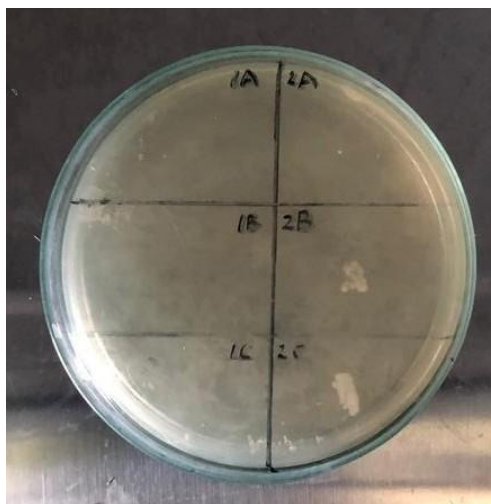
Konsentrasi (%)	Hasil Pengamatan	Interpretasi
4,0	Sumuran tetap jernih	Menghambat pertumbuhan
2,0	Sumuran tetap jernih	Menghambat pertumbuhan
1,0	Berwarna ungu	Tidak menghambat
0,5	Berwarna ungu	Tidak menghambat
0,25	Berwarna ungu	Tidak menghambat
0,125	Berwarna ungu	Tidak menghambat
0,0625	Berwarna ungu	Tidak menghambat
0,031	Berwarna ungu	Tidak menghambat
0,015	Berwarna ungu	Tidak menghambat
0,0078	Berwarna ungu	Tidak menghambat
0,0039	Berwarna ungu	Tidak menghambat
0,0019	Berwarna ungu	Tidak menghambat

Sumber: Data primer penelitian yang diolah dari hasil uji mikrodilusi.

Berdasarkan Tabel 1 dapat diketahui bahwa peningkatan konsentrasi minyak atsiri berbanding lurus dengan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Hanya dua konsentrasi tertinggi, yaitu 4% dan 2%, yang menunjukkan aktivitas antibakteri yang konsisten pada seluruh replikasi. Hasil tersebut menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam memiliki kemampuan bakteriostatik terhadap *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi minimal 2%.

Selain kelompok perlakuan, kontrol positif berupa eugenol memperlihatkan aktivitas antibakteri yang lebih kuat dibandingkan minyak atsiri daun sirih hitam, sedangkan kontrol negatif berupa DMSO 10% tidak menunjukkan adanya aktivitas penghambatan. Seluruh sumuran pada kontrol negatif mengalami perubahan warna menjadi ungu, yang menunjukkan bahwa pelarut DMSO tidak memberikan efek antibakteri terhadap *E. faecalis*. Sebaliknya, eugenol mempertahankan kejernihan media hingga konsentrasi yang lebih rendah, sehingga berfungsi sebagai kontrol positif yang sesuai dalam penelitian ini.

Setelah penentuan KHM, seluruh sumuran yang masih menunjukkan kondisi jernih dilanjutkan dengan pengujian Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) menggunakan metode *streak plate* pada media Nutrient Agar (NA). Metode ini bertujuan untuk memastikan apakah minyak atsiri hanya menghambat pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) atau benar-benar membunuh bakteri (bakterisidal).



Gambar 2. Hasil Uji Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) Minyak Atsiri Daun Sirih Hitam terhadap *Enterococcus faecalis*

Sumber: Data primer penelitian (2023).

Hasil pengamatan pada media Nutrient Agar setelah inkubasi selama 18–24 jam menunjukkan bahwa tidak semua konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri juga mampu membunuh bakteri. Pada konsentrasi 4% tidak ditemukan pertumbuhan koloni bakteri pada seluruh media, sedangkan pada konsentrasi 2% masih ditemukan pertumbuhan koloni pada sebagian pengulangan. Dengan demikian, konsentrasi 4% ditetapkan sebagai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) minyak atsiri daun sirih hitam terhadap *Enterococcus faecalis*.

Tabel 2. Penetapan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) Minyak Atsiri Daun Sirih Hitam terhadap *Enterococcus faecalis*

Konsentrasi (%)	Pertumbuhan Koloni	Interpretasi
4	Tidak ada	Membunuh bakteri
2	Masih ditemukan	Belum membunuh seluruh bakteri

Sumber: Data primer penelitian yang diolah dari hasil metode *streak plate*.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan konsentrasi yang mampu membunuh bakteri secara sempurna. Kondisi ini menunjukkan bahwa efek antibakteri minyak atsiri meningkat seiring bertambahnya konsentrasi, sehingga konsentrasi yang diperlukan untuk menghasilkan efek bakterisidal lebih tinggi dibandingkan konsentrasi yang hanya menghasilkan efek bakteriostatik.

Untuk mengetahui karakter aktivitas antibakteri minyak atsiri secara lebih komprehensif, dilakukan perhitungan rasio MBC/MIC. Rasio ini digunakan sebagai indikator apakah suatu senyawa lebih bersifat bakteriostatik atau bakterisidal.

Tabel 3. Rasio MBC/MIC Minyak Atsiri Daun Sirih Hitam terhadap *Enterococcus faecalis*

Pengulangan	MIC (%)	MBC (%)	MBC/MIC
1	2	2	1
2	2	4	2
3	2	4	2
Rata-rata	2	3,33	1,66

Sumber: Data primer penelitian.

Nilai rasio MBC/MIC sebesar 1,66 menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam memiliki karakter bakterisidal, karena nilai rasio berada di bawah batas ≤ 4 yang

umum digunakan untuk mengklasifikasikan agen antimikroba sebagai bakterisidal. Temuan ini memperlihatkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam tidak hanya mampu menghambat pertumbuhan *Enterococcus faecalis*, tetapi juga memiliki kemampuan membunuh bakteri pada konsentrasi tertentu. Secara keseluruhan, hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam memiliki potensi sebagai agen antibakteri alami terhadap *Enterococcus faecalis*, dengan KHM sebesar **2%**, KBM sebesar **4%**, dan rasio MBC/MIC sebesar **1,66**, yang mengindikasikan aktivitas bakterisidal.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam (*Piper betle* L. var. *nigra*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis* dengan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) sebesar 2% dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sebesar 4%. Selain itu, rasio MBC/MIC sebesar 1,66 mengindikasikan bahwa minyak atsiri tersebut bersifat bakterisidal, yaitu mampu membunuh bakteri, bukan sekadar menghambat pertumbuhannya. Temuan ini memiliki arti penting karena *E. faecalis* merupakan salah satu bakteri yang paling sulit dieliminasi pada infeksi endodontik persisten akibat kemampuannya bertahan dalam kondisi nutrisi rendah, membentuk biofilm, serta beradaptasi terhadap perubahan lingkungan saluran akar. Menurut Yang et al. (2024), karakteristik biologis tersebut menyebabkan *E. faecalis* tetap menjadi penyebab utama kegagalan terapi endodontik meskipun prosedur instrumentasi dan irigasi telah dilakukan secara optimal.

Kemampuan minyak atsiri daun sirih hitam dalam menghambat pertumbuhan *E. faecalis* diduga berkaitan erat dengan kandungan metabolit sekundernya. Analisis fitokimia pada penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam didominasi oleh senyawa chavicol, betlephenol, allylpyrocatechol, β -caryophyllene, dan menthone, yang diketahui memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri Gram positif maupun Gram negatif. Chavicol merupakan senyawa fenolik yang memiliki aktivitas antibakteri lebih kuat dibandingkan fenol karena mampu mengganggu integritas membran sitoplasma bakteri, meningkatkan permeabilitas membran, dan menyebabkan kebocoran komponen intraseluler. Mekanisme tersebut mengakibatkan hilangnya gradien proton, gangguan produksi ATP, serta berakhir pada kematian sel bakteri. Penelitian terkini juga menunjukkan bahwa senyawa fenolik pada minyak atsiri memiliki

kemampuan menghambat pembentukan biofilm melalui gangguan sistem quorum sensing, sehingga berpotensi mengurangi virulensi *E. faecalis* (Yang et al., 2024).

Selain chavicol, betlephenol juga berperan sebagai komponen aktif yang berkontribusi terhadap aktivitas antibakteri minyak atsiri daun sirih hitam. Senyawa ini bekerja melalui denaturasi protein membran dan kerusakan dinding sel sehingga menyebabkan lisis bakteri. Di samping itu, allylpyrocatechol diketahui menghambat enzim MurA yang berperan pada tahap awal biosintesis peptidoglikan. Hambatan terhadap enzim tersebut menyebabkan pembentukan dinding sel bakteri Gram positif menjadi tidak sempurna sehingga bakteri kehilangan integritas strukturalnya dan mengalami kematian. Aktivitas tersebut sangat relevan terhadap *E. faecalis* yang memiliki dinding sel tebal berbasis peptidoglikan. Temuan ini memperkuat dugaan bahwa efek bakterisidal minyak atsiri daun sirih hitam merupakan hasil sinergi berbagai senyawa aktif, bukan hanya satu komponen tunggal.

Hasil penelitian ini juga memperlihatkan bahwa nilai KHM minyak atsiri daun sirih hitam lebih tinggi dibandingkan kontrol positif eugenol. Berdasarkan hasil penelitian, eugenol mampu menghambat pertumbuhan *E. faecalis* pada konsentrasi 0,125%, sedangkan minyak atsiri daun sirih hitam memerlukan konsentrasi 2% untuk menghasilkan efek yang sama. Perbedaan tersebut menunjukkan bahwa eugenol masih memiliki potensi antibakteri yang lebih kuat secara kuantitatif. Namun demikian, eugenol diketahui memiliki keterbatasan berupa sifat sitotoksik pada konsentrasi tinggi terhadap fibroblas, osteoblas, dan jaringan periapikal sehingga penggunaannya perlu dibatasi. Sebaliknya, minyak atsiri daun sirih hitam berasal dari bahan alam yang berpotensi memiliki profil keamanan biologis lebih baik, meskipun penelitian mengenai toksisitasnya terhadap sel mamalia masih perlu dilakukan. Oleh karena itu, minyak atsiri daun sirih hitam memiliki prospek sebagai kandidat medikamen intrakanal berbasis herbal yang dapat dikembangkan lebih lanjut.

Apabila dibandingkan dengan penelitian lain mengenai tanaman dari genus *Piper*, hasil penelitian ini menunjukkan kecenderungan yang serupa. Berbagai penelitian melaporkan bahwa minyak atsiri *Piper betle* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, dan *Enterococcus faecalis*. Perbedaan nilai MIC antarpelitian umumnya dipengaruhi oleh metode ekstraksi, asal geografis tanaman, kandungan metabolit sekunder, serta metode

pengujian yang digunakan. Sebagian penelitian menggunakan metode difusi cakram sehingga menghasilkan diameter zona hambat, sedangkan penelitian ini menggunakan metode mikrodilusi yang memberikan nilai MIC dan MBC secara kuantitatif. Pendekatan mikrodilusi dinilai lebih sensitif karena tidak dipengaruhi kemampuan difusi minyak atsiri pada media agar, sehingga hasilnya lebih representatif untuk mengevaluasi efektivitas senyawa hidrofobik.

Metode mikrodilusi yang digunakan pada penelitian ini juga sesuai dengan rekomendasi penelitian antimikroba modern. Berbeda dengan metode difusi yang hanya menunjukkan kemampuan suatu senyawa membentuk zona hambat, metode mikrodilusi mampu menentukan konsentrasi minimal yang benar-benar menghambat pertumbuhan bakteri. Selanjutnya, kombinasi dengan metode streak plate memungkinkan penentuan apakah agen antibakteri bersifat bakteristatik atau bakterisidal. Rasio MBC/MIC sebesar 1,66 menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam memiliki kemampuan membunuh *E. faecalis*, sehingga efektivitasnya tidak hanya terbatas pada penghambatan metabolisme bakteri tetapi juga menyebabkan kematian sel. Rasio tersebut berada di bawah nilai ambang ≤ 4 yang secara luas digunakan untuk mengklasifikasikan suatu agen antimikroba sebagai bakterisidal.

Dari perspektif klinis, hasil penelitian ini memberikan implikasi penting bagi pengembangan medikamen intrakanal berbasis bahan alam. Infeksi saluran akar yang persisten umumnya disebabkan oleh kemampuan *E. faecalis* membentuk biofilm pada tubulus dentin, sehingga eliminasi bakteri menjadi lebih sulit dibandingkan bakteri planktonik. Walaupun penelitian ini masih dilakukan secara *in vitro* terhadap bakteri planktonik, kemampuan minyak atsiri daun sirih hitam dalam menghasilkan efek bakterisidal menjadi dasar ilmiah untuk penelitian lanjutan terhadap biofilm *E. faecalis*. Apabila efektivitas terhadap biofilm juga dapat dibuktikan, minyak atsiri ini berpotensi dikembangkan sebagai alternatif atau kombinasi medikamen intrakanal bersama bahan konvensional seperti kalsium hidroksida atau klorheksidin.

Penelitian ini juga memiliki nilai strategis dalam konteks pemanfaatan biodiversitas Indonesia. Sirih hitam merupakan tanaman yang tumbuh di berbagai wilayah Indonesia, termasuk Kalimantan Timur, sehingga pengembangan produk fitofarmaka berbasis minyak atsiri memiliki prospek yang baik dari sisi ketersediaan bahan baku.

Pengembangan bahan antibakteri lokal dapat mendukung kemandirian industri farmasi nasional sekaligus meningkatkan nilai tambah tanaman obat asli Indonesia.

Meskipun demikian, penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan. Pertama, pengujian dilakukan hanya terhadap satu strain bakteri standar *E. faecalis* ATCC 29212 sehingga belum menggambarkan variasi respons isolat klinis. Kedua, penelitian hanya mengevaluasi bakteri dalam bentuk planktonik, sedangkan pada kondisi klinis bakteri lebih sering berada dalam bentuk biofilm yang memiliki tingkat resistensi lebih tinggi. Ketiga, penelitian belum mengidentifikasi komposisi kimia minyak atsiri menggunakan analisis kromatografi seperti GC-MS sehingga hubungan antara kandungan senyawa aktif dengan aktivitas antibakteri masih bersifat inferensial. Keempat, penelitian belum mengevaluasi toksisitas minyak atsiri terhadap sel jaringan periapikal maupun fibroblas, sehingga aspek keamanan biologis belum dapat disimpulkan secara menyeluruh.

Berdasarkan keterbatasan tersebut, penelitian selanjutnya disarankan untuk melakukan karakterisasi komponen minyak atsiri menggunakan Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS), mengevaluasi aktivitas terhadap biofilm *Enterococcus faecalis*, menguji efek sitotoksik pada kultur sel mamalia, serta membandingkan efektivitas minyak atsiri daun sirih hitam dengan medikamen intrakanal standar seperti kalsium hidroksida, klorheksidin, maupun kombinasi bahan aktif lainnya. Selain itu, penelitian *in vivo* dan uji praklinis diperlukan untuk memastikan keamanan serta efektivitas minyak atsiri sebelum diaplikasikan sebagai kandidat medikamen endodontik.

Secara keseluruhan, penelitian ini memberikan bukti bahwa minyak atsiri daun sirih hitam (*Piper betle L. var. nigra*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis* dengan karakter bakterisidal. Hasil ini memperkuat potensi tanaman obat Indonesia sebagai sumber senyawa antimikroba alami dan membuka peluang pengembangan formulasi medikamen intrakanal berbasis fitofarmaka yang lebih aman, efektif, dan berkelanjutan dalam mendukung terapi endodontik modern.

KESIMPULAN DAN SARAN

Penelitian ini membuktikan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam (*Piper betle L. var. nigra*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Minyak atsiri mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang ditunjukkan melalui penetapan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) pada konsentrasi 2%, serta mampu membunuh bakteri yang ditunjukkan melalui Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) pada

konsentrasi 4%. Nilai rasio KBM/KHM menunjukkan bahwa minyak atsiri daun sirih hitam memiliki karakteristik sebagai agen antibakteri yang bersifat bakterisidal, sehingga berpotensi untuk dikembangkan sebagai bahan antibakteri alami dalam bidang kedokteran gigi, khususnya sebagai kandidat medikamen intrakanal pada terapi endodontik.

Temuan penelitian ini memberikan bukti ilmiah bahwa minyak atsiri daun sirih hitam merupakan salah satu sumber fitofarmaka yang memiliki potensi dalam mengendalikan pertumbuhan *Enterococcus faecalis*. Meskipun demikian, penelitian ini masih terbatas pada pengujian in vitro terhadap bakteri planktonik, sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk mengevaluasi efektivitas terhadap biofilm *E. faecalis*, mengidentifikasi senyawa aktif menggunakan analisis fitokimia yang lebih komprehensif, melakukan uji sitotoksitas dan biokompatibilitas, serta mengembangkan formulasi sediaan yang sesuai untuk aplikasi klinis di bidang endodontik. Dengan demikian, potensi minyak atsiri daun sirih hitam sebagai alternatif antibakteri herbal dapat dibuktikan secara lebih menyeluruh dan mendukung pengembangannya sebagai bahan terapeutik yang aman dan efektif.

DAFTAR PUSTAKA

- Abusrewil, S., Alshanta, O. A., Albashaireh, K., Alqahtani, S., Nile, C. J., Scott, J. A., & Ramadan, M. (2020). Detection, treatment and prevention of endodontic biofilm infections: What's new in 2020? *Critical Reviews in Microbiology*, 46(2), 194–212. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2020.1739622>
- Afkhami, F., Chen, Y., Walsh, L. J., Peters, O. A., & Xu, C. (2024). Application of nanomaterials in endodontics. *BME Frontiers*, 5, Article 0043. <https://doi.org/10.34133/bmef.0043>
- Alghamdi, F., & Shakir, M. (2020). The influence of *Enterococcus faecalis* as a dental root canal pathogen on endodontic treatment: A systematic review. *Cureus*, 12(3), e7257. <https://doi.org/10.7759/cureus.7257>
- Gaeta, C., Marruganti, C., Ali, I. A. A., Fabbro, A., Pinzauti, D., Santoro, F., & Neelakantan, P. (2023). The presence of *Enterococcus faecalis* in saliva as a risk factor for endodontic infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1061645>
- Haapasalo, M., Shen, Y., Wang, Z., & Gao, Y. (2021). Irrigation in endodontics. *British*

- Dental Journal, 231(5), 299–306. <https://doi.org/10.1038/s41415-021-3346-z>
- Nasim, I., Jha, K., & Mittal, S. (2021). Intracanal medicaments in endodontics: Current perspectives. *Journal of Conservative Dentistry*, 24(6), 523–531. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_468_20
- Pandey, A., Bhushan, J., Joshi, R. K., Uppal, A. S., Angrup, A., & Kansal, S. (2024). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of chitosan nanoparticles and calcium hydroxide against endodontic biofilm of *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Journal of Conservative Dentistry and Endodontics*, 27(7), 750–754. https://doi.org/10.4103/JCDE.JCDE_219_24
- Qi, J., Gong, M., Zhang, R., Song, Y., Liu, Q., Zhou, H., et al. (2021). Evaluation of the antibacterial effect of tea tree oil on *Enterococcus faecalis* and biofilm in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, 281, 114566. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114566>
- Said, H. S., Ibrahim, M., & Alharbi, F. (2022). *Enterococcus faecalis*: Virulence factors, antimicrobial resistance, and management strategies. *Antibiotics*, 11(11), 1596. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111596>
- Shen, Y., Haapasalo, M., & Wang, Z. (2022). Management of endodontic biofilms. *International Endodontic Journal*, 55(Suppl. 3), 357–380. <https://doi.org/10.1111/iej.13673>
- Soumya, B., Sreedevi, A., & Rajesh, E. (2021). Root canal obturation materials and techniques: A review. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 13(Suppl. 1), S62–S66. https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS_699_20
- Suresh, K. (2021). Chlorhexidine in endodontics: A review. *Journal of Conservative Dentistry*, 24(5), 451–458. https://doi.org/10.4103/JCD.JCD_315_21
- Torabinejad, M., Fouad, A. F., & Walton, R. E. (2020). *Endodontics: Principles and Practice* (6th ed.). Elsevier.
- Walsh, L. J. (2020). Essential oils as antimicrobial agents in dentistry. *Australian Dental Journal*, 65(Suppl. 1), S16–S26. <https://doi.org/10.1111/adj.12782>
- Yang, S., Meng, X., Zhen, Y., Baima, Q., Wang, Y., Jiang, X., & Xu, Z. (2024). Strategies and mechanisms targeting *Enterococcus faecalis* biofilms associated with endodontic infections: A comprehensive review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1433313. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1433313>

- Yuliarto, F., Kuspradini, H., & Rizki, M. (2021). Steam distillation optimization of essential oil from medicinal plants: A review. *Biodiversitas*, 22(11), 4890–4900. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d221124>
- Zhang, Y., Sun, J., Li, X., & Wang, L. (2023). Plant-derived antimicrobial compounds against oral pathogens: Mechanisms and future perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 8126. <https://doi.org/10.3390/ijms24098126>
- Zhou, X., Li, Y., Peng, X., & Cheng, L. (2022). Antibacterial phytochemicals and their application in oral infectious diseases. *Pharmaceutics*, 14(10), 2118. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102118>
- Erol, H. B., Kaskatepe, B., Gocmen, D., & Ziraman, F. G. (2024). The treatment of *Enterococcus faecalis*-related root canal biofilms with phage therapy. *Microbial Pathogenesis*, 197, 107081. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2024.107081>
- Neelakantan, P., Romero, M., Vera, J., Daood, U., Khan, A. U., Yan, A., Cheung, G. S. P., & Walsh, L. J. (2020). Biofilms in endodontics—Current status and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 8773. <https://doi.org/10.3390/ijms21238773>